

Aus dem Institut für Klinische Physiologie im Klinikum Steglitz
der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. med. K. Hierholzer

Der Natriumtransport an der isolierten
menschlichen Cornea und seine pH-Abhängigkeit

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Lothar Schmitz
aus Mönchengladbach

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Klinische Physiologie im Klinikum Steglitz
der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. med. K. Hierholzer

Der Natriumtransport an der isolierten menschlichen Cornea und seine pH-Abhängigkeit

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Lothar Schmitz
aus Mönchengladbach

Referent: Prof. Dr. M. Wiederholt

Korreferent: Prof. Dr. J. Wollensak

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin



Promoviert am: 23. August 1976

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1.0 <u>Einleitung</u>	1
2.0 <u>Methoden</u>	4
2.1 Untersuchtes Material	4
2.2 Versuchsaufbau	5
2.2.1 Meßkammer	5
2.2.2 PD-Messung	7
2.2.3 SCC-Messung	7
2.2.4 Temperaturregulierung	7
2.2.5 Registrierung	7
2.3 Perfusionslösung	8
2.4 Versuchsdurchführung	9
2.4.1 Temperaturversuche	9
2.4.2 pH-Versuche	10
2.5 Auswertung der Meßergebnisse	11
2.5.1 Na-Flux-Berechnung	11
2.5.2 PD-Berechnung	12
2.5.3 SCC-Berechnung	12
2.5.4 Ausrechnung	13
2.5.5 Statistik	13
3.0 <u>Ergebnisse</u>	14
3.1 Temperaturversuche	14
3.2 pH-Versuche	15
3.2.1 Wechsel von pH 7,6 auf pH 8,6	15
3.2.2 Wechsel von pH 8,6 auf pH 7,6	19
4.0 <u>Diskussion</u>	25
5.0 <u>Zusammenfassung</u>	35
6.0 <u>Literatur</u>	37

In dieser Arbeit wurden folgende Abkürzungen benutzt:

PD = Potentialdifferenz

SCC = Kurzschlußstrom

1.0 Einleitung

Die funktionelle Haupteigenschaft der Cornea besteht in der Durchsichtigkeit, welche sie grundsätzlich von der umgebenden Sklera unterscheidet. Das morphologische bzw. physiologische Substrat dieser Eigenschaft ist einerseits das Corneastroma, bestehend aus Mucopolysacchariden, die sich zu Fibrillen geordnet in einem bestimmten Hydratationszustand befinden (2, 3, 35), andererseits sind es Epithel, Bowman'sche Membran, Tränenflüssigkeit und Endothel, Descemet'sche Membran und Vorderkammerwasser, die den Hydratationszustand des Stromas in bisher ungeklärter Weise erhalten.

Bei den sogenannten Mucopolysaccharidosen (Hurler-Syndrom, Scheie-Syndrom, Maroteaux-Lamy-Syndrom) kommt es aufgrund der fehlerhaften Zusammensetzung der Stromafibrillen zu einer Corneatrübung. Häufiger führt aber eine Beeinträchtigung der an das Stroma angrenzenden Gewebe zu einem Corneaödem und so zum Verlust der Durchsichtigkeit. So führt eine Verletzung des Epithels oder des Endothels zu einer Quellung, d. h. der normale Wassergehalt von 72 % - 82 % (2) nimmt zu. Ebenso führen altersbedingte Degenerationerscheinungen und Entfernung von O_2 und Glukose aus dem Kammerwasser und der Tränenflüssigkeit zur Quellung und Trübung des bradytrophen Corneastromas (2, 3, 35). Diese klinischen Erfahrungen und weiter unten beschriebene Untersuchungen an der Tier- und Menschencornea lassen ein oder mehrere aktive Ionentransportmechanismen im Endothel bzw. Epithel der menschlichen Cornea vermuten. Eine stoffwechselabhängige Ionenpumpe, z. B. für Na, sollte durch verschiedene pH-Werte in ihrer Aktivität beeinflussbar sein.

Bisherige Untersuchungen an der Cornea wurden überwiegend am Rind, am Frosch und am Kaninchen angestellt.

An der Rindercornea stellten Modrell und Potts (28, 31) eine max. PD von 2,2 mV und einen max. SCC von $10,5 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ bei einem Temperaturoptimum von 27°C fest. Epithel war negativ gegenüber Endothel geladen. Entfernen von O_2 aus der Perfusionslösung, Hinzufügen von Dinitrophenol und Zerstören des Epithels ließen die PD zusammenbrechen. Kontinuierlicher Austausch von Na gegen K in der Perfusionslösung führte zu einer proportionalen Abnahme der PD und sogar zu einer geringen Umpolung. pII-Verschiebungen im Bereich pH 6 - pH 8 durch Veränderung der Bicarbonatkonzentration zeigten keinen Effekt auf PD und SCC. Lindemann (26) konnte diesen Na-K-Austauscheffekt an der Rindercornea reproduzieren. Auch hier scheint ein aktiver Na-Transport zu existieren.

An der Froschcornea wurden von Candia, Klyce und Zadunaisky (6, 7, 24, 35, 36) PDs von 10-60 mV, Epithel negativ gegenüber Endothel, und max. SCCs von $10 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ gemessen. Zadunaisky beschrieb einen pH-Effekt ähnlich dem an der menschlichen Cornea, jedoch fand keine Umpolung statt. Ein mit dem SCC übereinstimmender aktiver Cl-Auswärtstransport und ein passiv folgender Na-Flux wurden in Experimenten mit radioaktiv markierten Ionen nachgewiesen.

Die Kaninchencornea ist eingehend von Donn, Green, Akaike und Hori, Klyce, Zadunaisky und Fischer (1, 11, 16, 19, 24, 35) untersucht. Es fanden sich PDs von 6-40 mV, Epithel negativ gegenüber Endothel, SCC max. $10 \mu\text{A}/\text{cm}^2$. Hier konnte ein aktiver Na-Einwärtstransport, der mit dem gemessenen SCC übereinstimmt und dem passiv ein Cl-Flux folgt in Experimenten mit radioaktiv markierten Ionen nachgewiesen werden. Eine pH-Abhängigkeit wurde nicht festgestellt. Ezuka et al. (15)

wiesen einen zusätzlichen Ca-Transport nach.

Vergleichbare Untersuchungen an der menschlichen Cornea wurden erstmalig von Ehlers (14) unternommen, der an 7 Präparaten kein transepitheliales Potential feststellen konnte. Eine neuere Arbeit von Lichey et al. (25) liegt uns vor, der bei intrazellulärer Messung im menschlichen Corneaepithel in vitro eine PD von max. 45 mV fand. Fischer et al. (16) fanden bei transcornealen Messungen an der menschlichen Cornea PD- und SCC-Werte, die in der Größenordnung den Ergebnissen vergleichbar waren, die andere Autoren an tierischen Corneae erhalten hatten. Als Besonderheit ergab sich eine pH-abhängige Polarität der Menschencornea, und zwar war bei pH 8,6 das Epithel positiv gegen das Endothel geladen, während die Verhältnisse bei pH 7,6 sich regelmäßig umkehrten: das Epithel wurde negativ gegenüber dem Endothel. An Corneae von Rhesusaffen wurden gleiche Ergebnisse erzielt (17): bei pH 7,6 eine PD von 2-4 mV, Epithel negativ, bei pH 8,6 eine PD von 1-2 mV, Epithel positiv.

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, durch simultane PD-, SCC- und Na-Fluxmessungen Aussagen über membranphysiologische Verhältnisse an der menschlichen Cornea in vitro zu erhalten, die unter bestimmten Vorbehalten Rückschlüsse auf in-vivo-Verhältnisse zuließen. Mit der Voltage-Clamp Methode in Verbindung mit der radioaktiven Markierung der Na-Ionen war es möglich, die die PD produzierenden Mechanismen quantitativ zu beschreiben. Es ist erstmalig gelungen, den Einfluß verschiedener pH-Werte auf die oben genannten Parameter (PD, SCC, Na-Flux) gleichzeitig zu messen.

2.0 Methoden

2.1 Untersuchtes Material

Menschliche Cornea wurde 2-4 h post mortem bzw. sofort nach Eukleationsoperationen mit einem in der Augenklinik üblichen Trepan entnommen. Dabei wurde auf möglichst schonende Technik geachtet, d.h. sauberes Trepanieren möglichst ohne Nachschneiden mit der Schere, Vermeiden von Fältelungen durch Ziehen an der Cornea. Der Transport erfolgte mit der konkaven Endothelseite- also nur mit dem Rand - auf einem mit 0,9 %iger NaCl angefeuchteten Tupfer in einer feuchten Kammer bei ca. + 4⁰ C, so wie es bei keratoplastischen Operationen üblich ist (4). Die von vielen Autoren (3, 10, 11, 26, 31) beschriebene Anfälligkeit ionentransportierender Gewebe für mechanische Belastungen konnte für die menschliche Cornea bestätigt werden, womit wohl auch die von Präparat zu Präparat unterschiedlich hohen PD- und SCC-Werte zu erklären waren.

Die post mortem und nach Eukleationen gewonnenen Corneas zeigten im Experiment kein unterschiedliches Verhalten.

Es kamen nur Corneae zur Verwendung, die keine offensichtlichen krankhaften Veränderungen (Trübungen, Ulcera) zeigten.

Wir danken Herrn Prof. Dr. Köhn, Direktor des Pathol. Inst. des Städt. Krkhs. Neukölln, Herrn Prof. Dr. Maßhoff, ehem. Direktor des Pathol. Inst. im Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin und Herrn Priv. Doz. Dr. O. Liegl, Direktor der Augenklinik des Städt. Krkhs. Neukölln, für ihre Mithilfe beim Zustandekommen dieser Arbeit.

2.2 Versuchsaufbau

2.2.1 Meßkammer

30-60 min nach Entnahme wurde die Cornea zwischen die beiden Hälften einer nach Zadunaisky (36) modifizierten Ussing-Zerahm Kammer (33; Abb. 1) gespannt. Beide Kammerhälften waren bei allen Experimenten mit identischen Perfusionslösungen gefüllt.

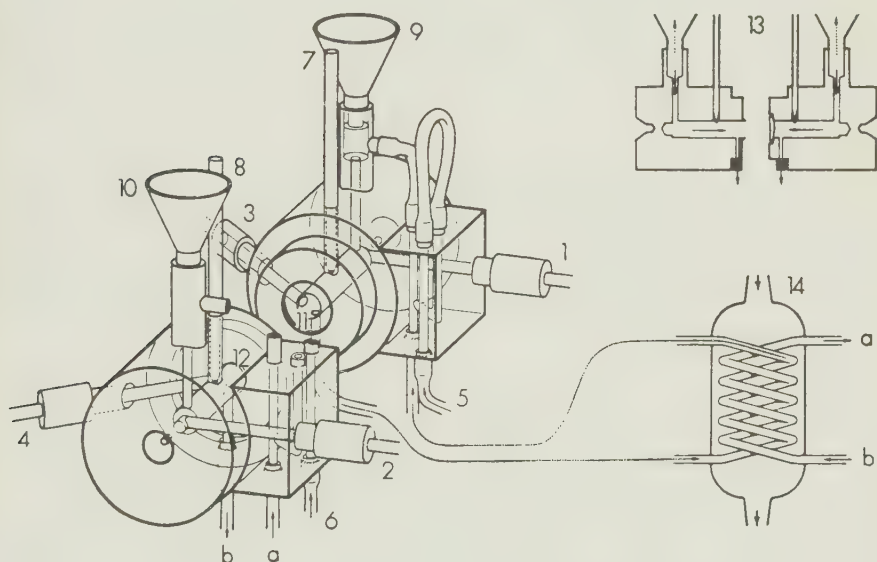


Abb. 1:

Skizze der verwendeten Meßkammer. 1, 2: Eingang für Heber zur SCC-Messung; 3, 4: Eingang für Heber zur PD-Messung; 5, 6: Eingang für Durchperlungsgas; a, b: Ein- bzw. Ausgang für zirkulierenden Ringer; 7, 8: Eingang für Temperaturmeßleiter; 9, 10: Ausgang für Durchperlungsgas; 11, 12: Perfusionsfläche; 13: Querschnitt der Kammer mit Flußrichtungspfeilen für Gas (gestrichelt) und Ringer-Lösung (ausgezogen); 14: Wärmetauscher.

Die freie Corneafläche betrug $0,33 \text{ cm}^2$. Der Randschaden, der nach Dobson und Kidder (10) und Walser (34) großen Einfluß auf PD und SCC hat, war bei unserer Versuchsanordnung vernachlässigbar klein, wie Fischer (16) gezeigt hat. Obwohl das Verhältnis Rand/freie Corneafläche relativ ungünstig lag, - wendet man Dobsons Versuchsergebnisse an der Froschhaut analog auf die menschliche Cornea an - entspräche das bei einem gegebenen Quotienten Rand/Fläche von $6,66 \text{ cm}^{-1}$ einem PD-Verlust von weniger als 30 %. Mit der von uns verwendeten Kammer erzielten Fischer et al. (16) an Kaninchencornea und Froschhaut ähnliche Werte wie andere Autoren (1, 11, 16, 19, 23, 24, 35).

Die beiden Kammerhälften konnten einander nur bis 0,5 mm genähert werden, bei einer Dicke der Cornea von 0,8 mm. Das ergab eine relativ geringe Druckbelastung des Cornearandes bei sicherer Abdichtung der Kammerhälften gegeneinander.

Die Durchperlung der Perfusionslösung mit Druckluft bzw. 5 % CO_2 + 95 % Druckluft geschah durch den in Abb. 1; 5 sichtbaren Eingang. Das Durchperlungsgas nahm ein Stück gemeinsamer Wegstrecke mit dem einfließenden Ringer, bevor es durch den konischen Stutzen entwich. Die mit den Bestandteilen des Gasgemisches aufgesättigte Perfusionslösung floß nun unmittelbar an der Cornea vorbei, da - wie in Abb. 1; 13 sichtbar - der Abfluß aus der Kammer unterhalb der eingespannten Cornea lag. Damit war die O_2 -Versorgung des Präparates gewährleistet, ohne daß ein direkter Kontakt mit dem Gas zustande kam. Das Kammervolumen (hier und im folgenden immer einschließlich des Volumens von Wärmetauscher und Zuleitungen berechnet) betrug bei den Temperaturversuchen 8 ml, bei den Isotopenversuchen 6 ml/Kammerhälfte.

Auf dem Arbeitsplatz wurde mit zwei Kammern gearbeitet, so daß entnommene Corneapaare gleichzeitig untersucht werden konnten.

2.2.2 PD-Messung

Die PD wurde mit einem Voltmeter (Fa. Knick Typ mV 37) über Kalomelelektroden (Fa. Ingold Typ 303), die mittels KCl-Agarhebern (Abb. 1; 3, 4) mit der Perfusionslösung in unmittelbarer Nähe der Cornea in Verbindung standen, gemessen.

2.2.3 SCC-Messung und Voltage-Clamp

Dazu dienten Ag/AgCl-Elektroden, die wiederum mittels KCl-Agarhebern (Abb. 1; 1, 2) mit der Perfusionslösung in Verbindung standen. Spannungsquelle war eine 1,5 V Trockenbatterie, deren Stromabgabe über einen handregelbaren Spannungsteiler gesteuert und von einem Mikroamperemeter gemessen wurde.

2.2.4 Temperaturregulierung

Die Temperatur wurde über ein Thermostat (Fa. Haake) in Verbindung mit einem Wärmetauscher (Abb. 1; 14) geregelt. Die Temperatur in den einzelnen Kammerhälften und die Temperaturdifferenz zwischen den Kammerhälften konnte mit NTC-Meßheißleitern (Fa. Siemens Typ K 17; Abb. 1; 7, 8), über Wheatstone'sche Brückenschaltung mit einem geeichten Spannungsmesser (Fa. Knick Typ 350) verbunden, verfolgt werden.

2.2.5 Registrierung

PD, SCC und Temperatur wurden von einem 6-Kanal-Punkt-drucker-Kompensationsschreiber (Fa. Withof) unmittelbar registriert.

2.2.6 Blockschaltbild der Versuchsanordnung

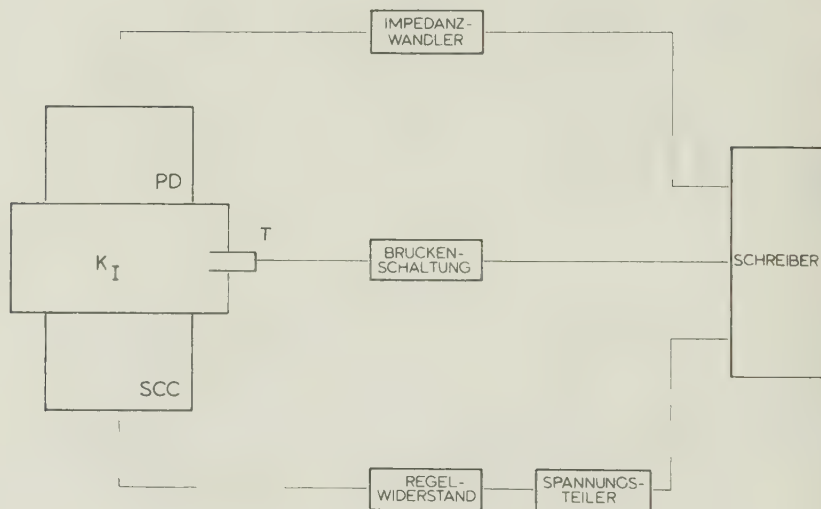


Abb. 2:

PD = Elektroden zur Potentialdifferenzmessung,

SCC = Elektroden zum Messen des Kurzschlußstromes,

T = Temperaturmeßfühler, K_I = Meßkammer

2.3 Perfusionslösung

Als Perfusionslösung benutzten wir einen Warmblüter-Ringer nach Donn et al. (11) mit folgender Zusammensetzung: NaCl 118,5 mM; KCl 4,14 mM; $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ 0,744 mM; KH_2PO_4 1,19 mM; $CaCl_2$ 1,69 mM; $NaHCO_3$ 26,2 mM; Dextrose 5,12 mM. Die Osmolalität der Lösung wurde mit einem

Osmometer über die Gefrierpunktniedrigung bestimmt und betrug im Mittel 312 mosmol/kg bei einem Schwankungsbereich von 305-320 mosmol/kg.

Bei einem Teil der Temperaturversuche und allen Versuchen mit radioaktiven Isotopen wurde der Lösung Penicillin und Streptomycin in einer Konzentration von je 0,1 mg/ml Ringer zugesetzt, um einen evtl. Einfluß von Bakterien auf die Transporteigenschaften der Cornea (21, 23) auszuschließen. Wie schon von Hutchinson und Porter (20) an der Krötenblase beschrieben, konnten auch wir bei Zugabe der Antibiotika keinen Einfluß auf aktiven Transport, PD und SCC der menschlichen Cornea feststellen.

Der pH-Wert der Lösung wurde mit einem Astrup-Micro-Equipment (Fa. Radiometer) gemessen.

2.4 Versuchsdurchführung

2.4.1 Temperaturversuche

Da PD und SCC schon unter konstanten Temperaturbedingungen beträchtlich unterschiedliche Werte in verschiedenen Corneae erlangen können, entschlossen wir uns, die Temperatur während des Versuchs zu ändern. Die Versuchsdauer betrug im Schnitt 180 min, davon in der Versuchsreihe 70 min bei + 35° C und 110 min bei + 28° C. Zwei Einzelversuche mit umgekehrter Reihenfolge der Temperaturen wurden angeschlossen.

Die Änderung der Temperatur der Perfusionslösung gelang zuverlässig mit dem oben beschriebenen Thermostaten in ca. 10 min. In der Versuchsreihe wurde die PD kontinuierlich gemessen und etwa alle 10 min. kurzzeitig die Cornea zum Messen des SCC kurzgeschlossen.

2.4.2 pH-Versuche

Zur Bestimmung des Nettotransportes von Na stehen zwei Methoden zur Verfügung:

einmal die Doppelmarkierungsmethode (30), bei der in unserem Falle in eine Kammerhälfte Na^{24} in die andere Na^{22} eingebracht worden wäre; diese Methode erlaubt die Bestimmung des Na-Nettofluxes jeder einzelnen Cornea;

zum zweiten kann ein Na-Isotop in zwei Versuchsreihen benutzt werden, in denen je der Flux von der Epithel- zur Endothelseite bzw. der umgekehrte Flux gemessen wird.

Hat man eine statistisch auswertbare Anzahl von Versuchen, läßt sich aus den unidirektionalen Fluxen der Nettotransport berechnen.

Wir wählten den zweiten Weg, weil wir uns für ein Isotop mit langer Halbwertszeit entscheiden mußten (t_s von $\text{Na}^{22} = 2,58 \text{ a}$), da wegen des unregelmäßigen Anfalls der Cornea-Präparate die Versuche nicht exakt zeitlich zu planen waren. Es wurde Na^{22} (Fa. New England Nuclear Corp., $^{22}\text{NaCl}$ in 0,5 M HCl, trägerfrei, spez. Akt.: 2,43 mC/ml) in einer Konzentration von 4,15 $\mu\text{C/ml}$ Perfusionslösung benutzt.

Durch Wahl verschiedener Durchperlungsgase ließ sich leicht ein pH von $8,6 \pm 0,1$ (Luft) bzw. $7,6 \pm 0,1$ (Luft + 5 % CO_2) in der Perfusionslösung einstellen. Wegen der erwähnten Unterschiedlichkeit der Corneae in Bezug auf die Höhe von PD und SCC, wurde der pH während des Versuchs geändert.

Die Experimente fanden bei einer Perfusionslösungstemperatur von $32 \pm 1^\circ \text{C}$ statt. Nach Untersuchungen von Fischer et al. (16), beträgt die intra operationem gemessene Temperatur der Epitheloberfläche der menschlichen Cornea $31,7^\circ \text{C}$ und ist

nicht wesentlich verschieden von der Temperatur der Endothelseite.

Zur Bestimmung des gesamten aktiven Transportes an der Cornea wurde die Voltage-Clamp-Methode angewendet (6, 12, 33, 36). Die PD wurde durch 10 minütige kurzzeitige Messungen registriert.

In zwei Versuchsreihen von je 270 min. Dauer wurde das Verhalten der Cornea auf verschiedene pH-Werte und pH-Änderung geprüft. Nach Einspannen des Präparates in die Kammer registrierten wir für 30 min. die PD. Danach erfolgte Zugabe des Nuklids in eine Kammerhälfte und Voltage-Clamp für die restlichen 240 min. Während dieser 4 h wurde einmal der pH der Perfusionslösung geändert und zwar in der 1. Versuchsreihe von anfänglich pH 7,6 auf pH 8,6 und in der 2. Versuchsreihe von pH 8,6 auf pH 7,6 nach jeweils 120 min. Proben aus der markierten Kammerhälfte wurden nur am Anfang und am Ende des Versuchs entnommen (10 µl). In den nicht markierten Kammerhälften tauschten wir halbstündlich die Perfusionslösung aus. Die Aktivitäten in den Proben wurden mit einem γ-Szintillationszähler gemessen.

2.5 Auswertung der Meßergebnisse

2.5.1 Na-Flux-Berechnung

Aktivitätsmessungen wurden als signifikant angesehen, wenn sie den dreifachen Wert des Background überstiegen hatten. Der unidirektionale Flux läßt sich nach folgender Gleichung berechnen:

$$F = \frac{V_x \cdot \Delta a_x \cdot c_m \cdot 60}{A \cdot t \cdot a_m} \quad (1)$$

V_x = Volumen der nicht markierten Kammerhälfte (ml)

Δa_x = Aktivitätszunahme auf der nicht markierten Seite (cpm/ml)

A = freie Cornealfläche (cm²); t = Perfusionszeit (min)

- a_m = Aktivität auf der markierten Seite (cpm/ml)
 c_m = Konzentration des Ions in der Perfusionslösung ($\mu\text{Äq/ml}$)
 F = Flux in die nicht markierte Seite ($\mu\text{Äq/cm}^2 \cdot h$)

Bezeichnet man den Flux von der Epithel zur Endothelseite als Influx (F_i), und den von der Endothel- zur Epithelseite als Outflux (F_o), dann ergibt sich der Nettoflux als

$$F_{\text{net}} = F_i - F_o \quad (2)$$

2.5.2 PD-Berechnung

Kalomelektroden und Heber zum Messen der PD haben gewöhnlich ein geringes Asymmetriepotential. Es wurde zu Anfang und zum Ende des Versuchs gemessen. PDs, die den dreifachen Betrag des höchsten gemessenen Asymmetriepotentials überschritten, wurden als signifikant angesehen.

2.5.3 SCC-Berechnung (13, 22)

Die Werte des SCC erhielten das Vorzeichen der dazugehörigen PD.

Ziel der Experimente war es, eine evtl. Übereinstimmung des Na-Transportes mit dem SCC festzustellen. Es bestehen folgende Beziehungen zwischen einem Flux und dem gleichzeitig gemessenen SCC:

- Das Faraday'sche Gesetz besagt, daß 1 gÄq eines Stoffes 96500 Coulomb transportiert. ($96500 = F_z = \text{Faraday'sche Zahl}$)

- 1 A = 1 Coulomb/s

es gilt also

$$\frac{I \text{ (As/s)}}{F_z \text{ (As/Äq)}} = \frac{I \text{ (Äq)}}{96500 \text{ (s)}}$$

wobei I die Stromstärke bedeutet. Für die Cornea, wo der

Transport in $\mu\text{Äq}$ und der SCC in μA gemessen wird und auf cm^2 transportierende Fläche und h bezogen wird, gilt also die obige Beziehung in folgender Form:

$$\frac{I \cdot t (\mu\text{A} \cdot \text{s})}{F \cdot F_z (\text{cm}^2 \cdot \text{As}/\text{Äq})} = \frac{m (\mu\text{Äq})}{F \cdot t (\text{cm}^2 \cdot \text{h})} \quad (3)$$

wobei I = Stromstärke, F = Fläche, F_z = Faraday'sche Zahl, m = Masse, t = Zeit.

Durch die Bestimmung des Nettoflux erhält man den Wert für die rechte Seite der Gleichung 3, durch entsprechende Umrechnung des gemessenen SCC die linke Seite von (3). Geht Gleichung 3 auf, so läßt sich der gemessene SCC durch den gemessenen Stofftransport erklären, anderenfalls existieren zusätzliche Transporte.

2.5.4 Ausrechnung

Zur Auswertung des Na-Flux erstellten wir ein FOCAL - Programm (Formulating On Line Calculations In Algebraic Language) auf einem PDP-8 Computer der Fa. Digital.

2.5.5 Statistik (5, 18)

Für alle Mittelwerte wurde der mittlere Fehler des Mittelwertes (SE) berechnet. Die Beurteilung der Unterschiede zweier Mittelwerte geschah nach dem t-Test. Für die Beurteilung der Signifikanz wurde $p \leq 0,05$ festgelegt. Die Korrelation von SCC und Na-Nettoflux wurde mit dem Rangkorrelationskoeffizienten τ von Kendall angegeben.

3.0 Ergebnisse

3.1 Temperaturversuche

Der Kurvenverlauf der Mittelwerte ($n = 6$) von PD und SCC (Abb. 3) gab keinen Anhalt dafür, daß die beiden Parameter in signifikanter Weise auf einen Temperaturwechsel in der Perfusionslösung von 35°C auf 28°C reagierten (für PD $p > 0,2$; für SCC $p > 0,1$). Vielmehr ist der glatte Kurvenverlauf mit Anstieg von PD und SCC in den ersten beiden Stunden und anschließendem Verharren auf diesem Niveau auch bei allen vorhergehenden Versuchen ohne Temperaturverschiebung nachgewiesen worden. PD- und SCC-Kurven verlaufen gleichsinnig und parallel. Die PD war negativ, Epithel gegen Endothel gemessen, was bei pH 7,6 das Normalverhalten der menschlichen Cornea darstellt (17, siehe auch 3,2). In zwei Einzelversuchen, bei denen zuerst eine Temperatur von 28°C und nach 70 min. 35°C in der Perfusionslösung eingestellt wurde, zeigten PD und SCC ebenfalls keine Temperaturabhängigkeit.

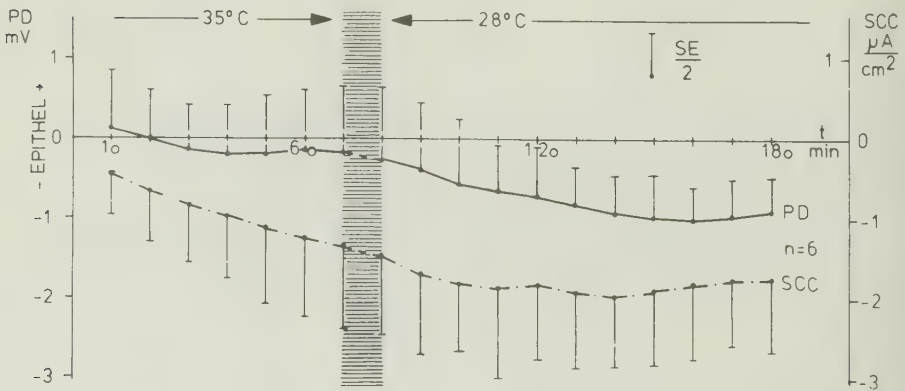


Abb. 3: Verlauf der 10-min. -Mittelwerte der PD und des SCC in 6 Temperaturversuchen. Schraffiert ist die Zeit des Temperaturwechsels.

3.2 pH-Versuche

3.2.1 Wechsel von pH 7,6 auf pH 8,6

In dieser Versuchsreihe ($n = 11$) wurde anfänglich 2 Stunden lang mit 5 % CO_2 + 95 % Luft (pH 7,6), danach nur mit Luft (pH 8,6) durchperlt. Die Verlaufskurven der Halbstundenmittelwerte der untersuchten Parameter sind in Abb. 4 und Abb. 5 dargestellt.

Auf den pH-Wechsel in der Perfusionslösung erfolgte in den meisten Fällen eine unmittelbare Änderung von PD und SCC (Abb. 10). Bei pH 7,6 war in allen Fällen die Epithelseite negativ gegen die Endothelseite geladen. pH 8,6 führte zum stetigen Zusammenbruch des negativen Potentials an der Außenseite der Cornea und schließlich zum Aufbau eines positiveren Potentials innerhalb 60 min. nach pH-Wechsel; und zwar fand in 5 Fällen eine Umpolung statt, in weiteren 2 Fällen wurde das Potential signifikant positiver, in weiteren 4 Fällen zeigte sich allerdings keine signifikante Änderung von PD und SCC. Bis zum Ende der Versuche blieb das Corneapotentia dann in allen Fällen stabil auf dem neuen Niveau.

Die Durchschnittswerte der PD betrugen max. $-1,75 \pm 0,9$ mV in der ersten Versuchshälfte und $+0,6 \pm 0,4$ mV in der zweiten Hälfte.

Die Durchschnittswerte des SCC erreichten in der ersten Versuchshälfte max. $0,75 \pm 0,4 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ und wurden offensichtlich durch pH 8,6 stimuliert (max. $1,75 \pm 1,4 \mu\text{A}/\text{cm}^2$).

Die entsprechenden Na-Fluxe (Abb. 5 + 6) zeigten bei pH 7,6 einen Nettoflux, der sich nur geringfügig von 0 unterschied.

Der unidirektionale Influx (Epithel - Endothel) blieb auch nach Änderung des pH auf 8,6 konstant ($p > 0,6$). Eine stetige und signifikante ($p < 0,005$), auf den Wechsel des pH folgende Stimulierung des unidirektionalen Outflux (Endothel-Epithel) um fast 300 % ergab in der zweiten Hälfte des Experiments einen steigenden Nettoflux von Na auf die Epithelseite der Cornea.

Die Mittelwerte der Fluxe in den beiden Versuchsperioden (Abb. 6) zeigten eine signifikante Zunahme des unidirektionalen Na-Transportes von der Endothel zu Epithelseite bei pH 8,6. Eine Bedeutung des Na-Fluxes für die Umpolung des Cornea-potentials ist daher wahrscheinlich.

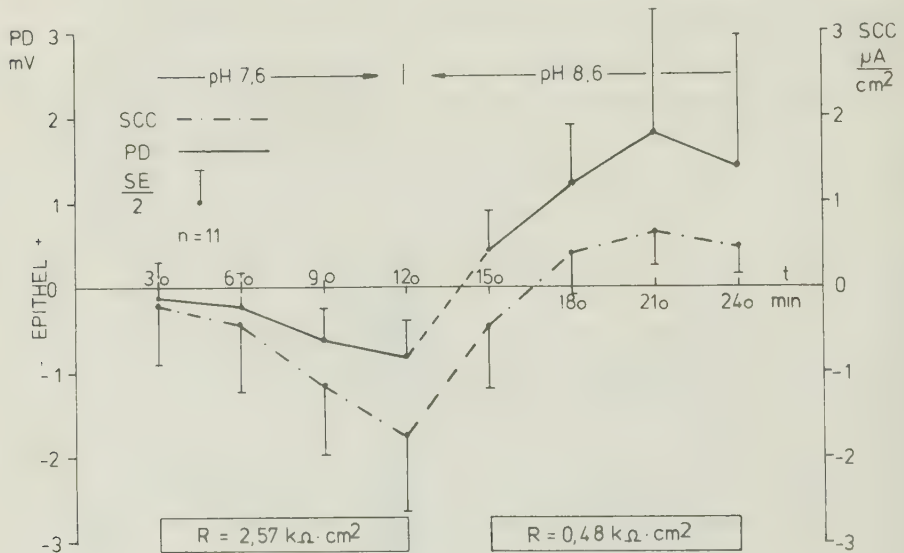


Abb. 4:

Verhalten von PD und SCC beim Wechsel von pH 7,6 auf pH 8,6. In den Kästen, der während einer Versuchshälfte (2 h) bestehende gemittelte Gesamtwiderstand der Cornea, rechnerisch aus der gemessenen Stromstärke und Spannung ermittelt

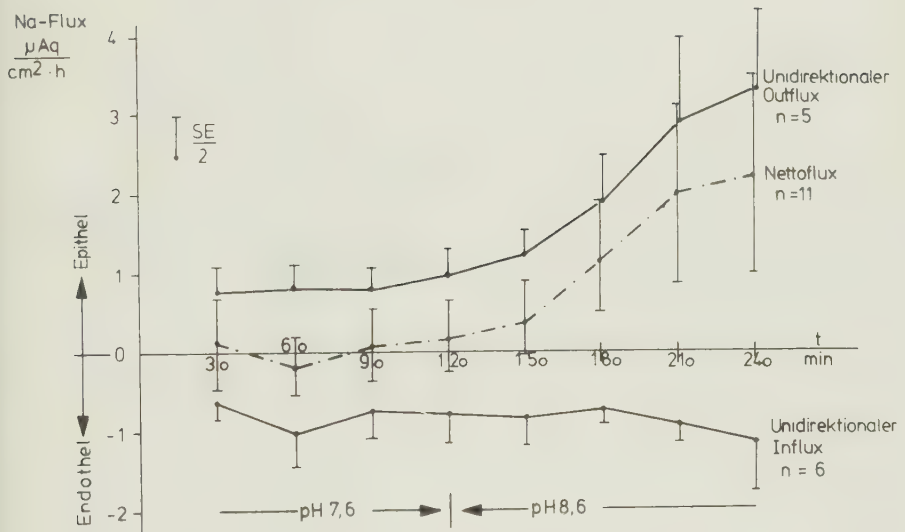


Abb. 5:

Verhalten von Na-Influx, Na-Outflux und dem daraus resultierenden Na-Nettoflux beim Wechsel von pH 7,6 auf pH 8,6.

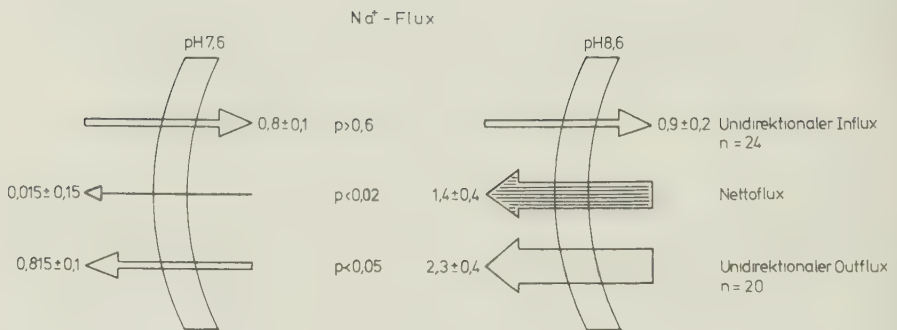


Abb. 6:

Corneamodell mit Darstellung der Fluxstärken und Fluxrichtungen in der Versuchsreihe 3. 2. 1 mit Angaben über die Signifikanz (p) der Fluxänderungen bei pH 8, 6 gegenüber pH 7, 6. Alle Fluxangaben in $\mu\text{Äq}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$.

3.2.2 Wechsel von pH 8,6 auf pH 7,6

In weiteren 11 Versuchen wurde die Reihenfolge der Durchperlung der Perfusionslösung so geändert, daß zuerst mit Luft (pH 8,6), danach mit 5 % CO₂ + 95 % Luft (pH 7,6) durchperlt wurde.

Abb. 7 und Abb. 8 geben das Verhalten der Mittelwerte der untersuchten Parameter wieder.

PD und SCC verhielten sich wie in der ersten Versuchsserie gleichsinnig. Auf Änderung des pH folgte wiederum unmittelbar eine Änderung von PD und SCC, so daß es zum Aufbau der neuen PD schon innerhalb 30 min. nach Wechsel der Durchperlung kam. Bei pH 8,6 war die Epithelseite positiv gegen die Endothelseite geladen. pH 7,6 führte zum sofortigen Umpolen der Cornea in 5 Fällen, zu signifikant negativeren Potentialen in weiteren 5 Fällen und zu keiner eindeutigen Reaktion in nur 1 Fall. Das negativere Potential der Epithelseite blieb in allen Experimenten bis zum Versuchsende stabil.

Die Durchschnittswerte der PD waren wiederum in der ersten Versuchshälfte höher (max. $+2,25 \pm 0,4$ mV) als in der zweiten Hälfte (max. $-1,1 \pm 0,5$ mV).

Die Durchschnittswerte des SCC lagen bei pH 8,6 konstant bei etwa $2,3 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (max. $2,4 \pm 0,6 \mu\text{A}/\text{cm}^2$) und erreichten beim pH 7,6 einen Maximalwert von $1,1 \pm 0,5 \mu\text{A}/\text{cm}^2$.

Der Na-Flux (Abb. 8) zeigte kein derart eindeutiges Verhalten wie in der ersten Versuchsreihe. Das anfängliche Überwiegen des unidirektionalen Outflux nahm rasch ab und stieg erst kurz vor dem Wechsel des pH wieder an. pH 7,6 hatte eine Angleichung der beiden unidirektionalen Fluxes zur Folge,

sie bewegten sich bei $1,25 \mu\text{Äq}/\text{cm}^2 \text{ h}$. pH 8,6 steigerte den unidirektionalen Influx leicht auf $\text{max. } 2,2 \pm 0,8 \mu\text{Äq}/\text{cm}^2 \text{ h}$, und der unidirektionale Outflux erreichte einen Spitzenwert von $3,25 \pm 1,1 \mu\text{Äq}/\text{cm}^2 \text{ h}$.

Die Mittelwerte der Fluxe in den beiden Versuchsperioden (Abb. 9) zeigten eine signifikante Abnahme ($p < 0,05$) des Na-Transportes auf die Epithelseite bei pH 7,6. Der Na-Flux von der Epithel- zur Endothelseite zeigte keine signifikante Änderung ($p > 0,1$).

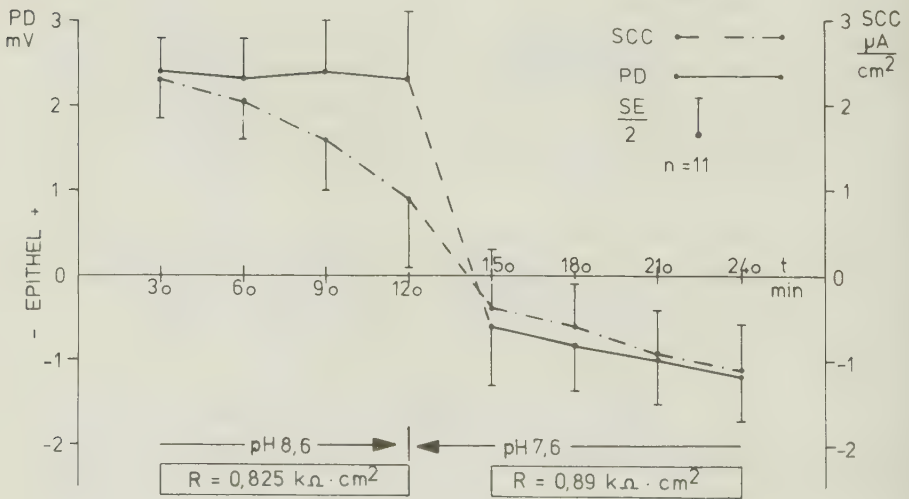


Abb. 7:

Verhalten von PD und SCC beim Wechsel von pH 7,6 auf pH 8,6. In den Kästen, der während einer Versuchshälfte (2 h) bestehende gemittelte Gesamtwiderstand der Cornea, rechnerisch aus der gemessenen Stromstärke und Spannung ermittelt.

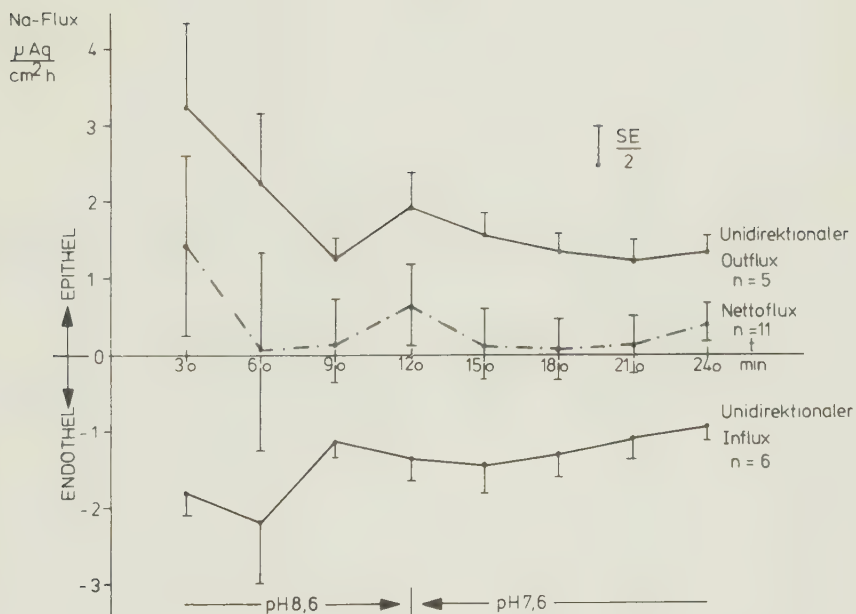


Abb. 8:

Verhalten von Na-Influx, Na-Outflux und dem sich daraus ergebenden Na-Nettoflux beim Wechsel von pH 8,6 auf pH 7,6.

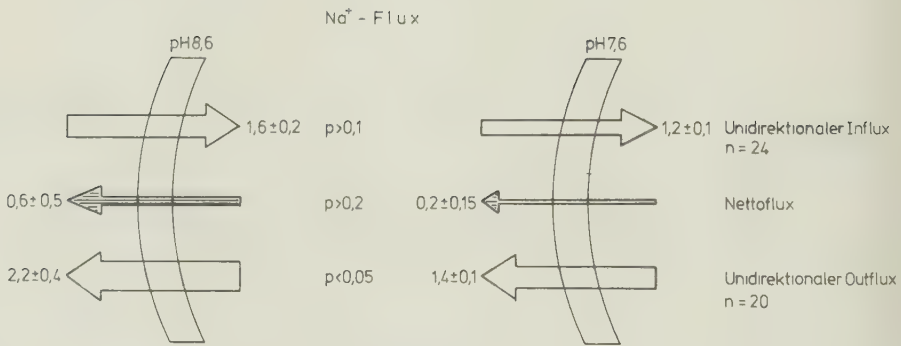


Abb. 9:

Corneamodell mit Darstellung der Fluxstärken und Fluxrichtungen in der Versuchsreihe 3. 2. 2 mit Angaben über die Signifikanz (p) der Fluxänderungen bei pH 7, 6 gegenüber pH 8, 6. Alle Fluxangaben in $\mu\text{Äq}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$.

Die Änderung des Na-Transportes war geringer, wenn der pH der Perfusionslösung in der ersten Versuchshälfte 8,6 betrug. Offenbar hatte die Reihenfolge der Applikation verschiedener pH-Werte Einfluß auf die Größe der Transportraten für Na, änderte aber nichts an der Richtung und dem grundsätzlichen Verhalten einer signifikanten Stimulierung des unidirektionalen Na-Outflux bei pH 8,6 (Abb. 12).

Abb. 10 gibt den typischen Verlauf der Kurven von PD und SCC im Einzelversuch wieder. Nach der anfänglichen Äquilibrierungsphase, während der nur die PD registriert wurde, folgte Zugabe des Nuklids und kontinuierliche Registrierung des SCC. Kurzzeitige Messungen der PD wurden regelmäßig durchgeführt. Deutlich ist der sofortige Zusammenbruch von PD und SCC nach Einstellung des neuen pH-Wertes zu sehen, gefolgt von der Umpolung des Corneapentials.

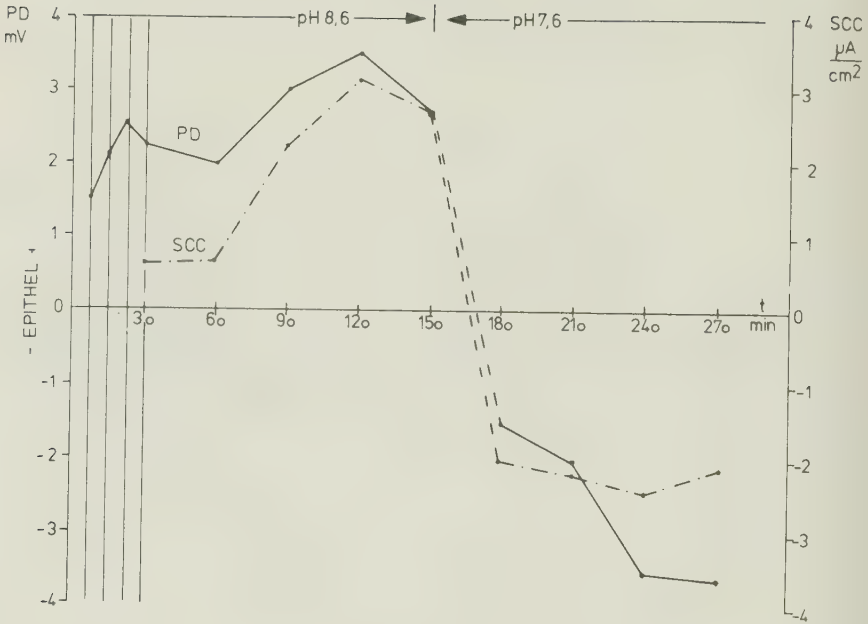


Abb. 10:

Typischer Versuchsablauf im Einzelexperiment dokumentiert. Schraffiert ist die Äquilibrierungsphase bis 30 min nach Einspannen der Cornea dargestellt. (Versuch vom 22. 2. 73 K II)

4.0 Diskussion

In unseren Versuchen ist es erstmalig gelungen, den Einfluß zweier verschiedener pH-Werte auf PD, SCC und Na-Flux an der menschlichen Cornea zu messen.

Die Experimente fanden bei einer Temperatur von $32 \pm 1^{\circ} \text{C}$ statt und entsprachen in dieser Beziehung den in vivo Bedingungen beim Menschen. Fischer et al. (16) konnte bei Messungen an der menschlichen Cornea intra operationem zeigen, daß die Temperatur der Epithelseite $31,7^{\circ} \text{C}$ betrug und nicht wesentlich verschiedenen von derjenigen der Endothelseite war. Unsere Temperaturversuche zeigten, daß im Bereich von 28°C - 35°C kein signifikanter Einfluß auf PD und SCC bestand. Somit ließen sich unsere an der menschlichen Cornea gewonnenen Ergebnisse mit denen anderer Autoren (1, 6, 11, 15, 19, 24, 26, 28, 31, 35) vergleichen, die an Versuchstieren durchweg in dem oben erwähnten Temperaturbereich gearbeitet haben.

Die Methoden der Vorbereitung (Corneaentnahme, Transport, Einspannen in die Kammer) und die Durchführung der Versuche entsprachen weitgehend den in der Literatur angegebenen Bedingungen. Durch die Art der Vorbereitung bestand somit für unsere Experimente eine Fehlerquelle, die nicht beseitigt werden konnte und vor allem nicht quantitativ objektivierbar war. Eine weitere Fehlerquelle lag in der geringen Standardisierbarkeit des von Leichen gewonnenen Untersuchungsmaterials. Es wurden jedoch nur Präparate entnommen von Patienten, die keine ophtalmologischen Erkrankungen aufwiesen.

Alle erwähnten Voraussetzungen führten zu einer relativ großen Variabilität der PD-, SCC- und Fluxwerte. Diese Streubreiten

wurden auch von anderen Autoren (7, 16, 35) bei Tierexperimenten beschrieben. Wir haben uns keine absoluten Grenzwerte in Bezug auf die Auswertung der untersuchten Parameter gesetzt, weil uns eine willkürliche Auslese der Experimentiererergebnisse nicht gerechtfertigt erschien. Andererseits mußten wir auf diesem Wege hohe Standardabweichungen und in manchen Fällen niedrige Signifikanzen in Kauf nehmen.

Aus unseren Ergebnissen (3. 2. 1 und 3. 2. 2) läßt sich ein eindeutiges und in den meisten Fällen signifikantes Ansprechen von PD und SCC auf Änderung des pH erkennen. Während der SCC in beiden Versuchsreihen bei pH 8,6 deutlich stimuliert wurde, war bei der PD abgesehen von der Umpolung bei pH-Wechsel noch zu erkennen, daß sie stets in der ersten Versuchshälfte maximale Werte erreichte und zum Versuchsende hin geringer wurde. Diese Abhängigkeit des PD-Verlaufs von der Versuchsdauer ist von allen Autoren beschrieben worden.

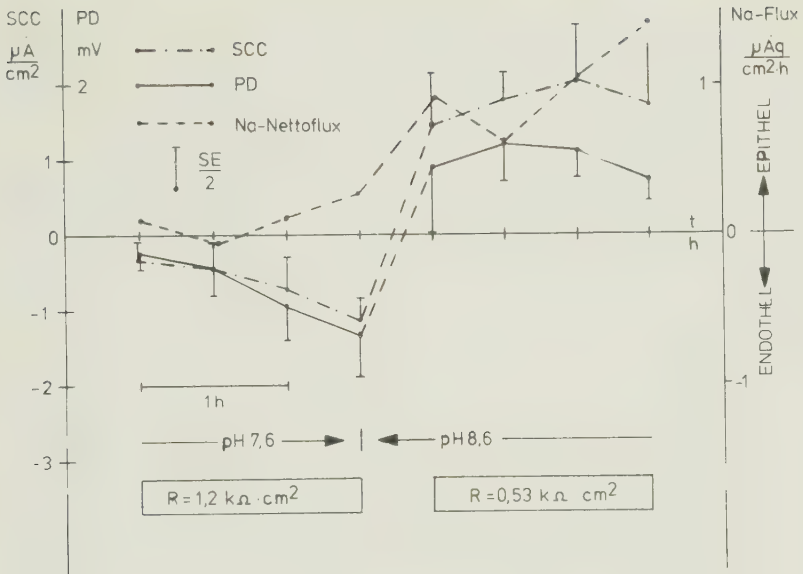


Abb. 11:

SCC, PD und Na-Nettoflux aus beiden Versuchsreihen 3.2.1 und 3.2.2 übereinanderprojiziert zeigen einen engen funktionellen Zusammenhang dieser drei Größen.

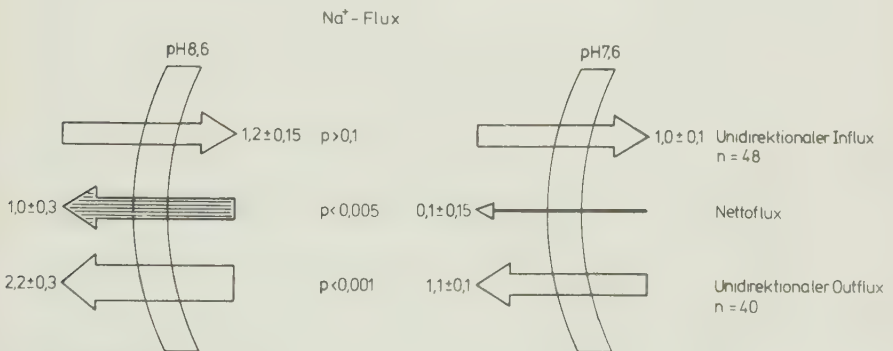


Abb. 12:

Corneamodell mit Darstellung der Na-Fluxe in Stärke und Richtung in Abhängigkeit vom pH. Beide Versuchsreihen sind unabhängig von der Reihenfolge des pH-Wechsels in das Modell eingegangen. Alle Fluxangaben in $\mu\text{Aq}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$. p gibt die Signifikanz der Fluxänderung an.

Mittelt man die Halbstundenwerte von PD, SCC und Na-Nettofluxen aller Versuchsperioden gleichen pH-Wertes, so erhält man Abb. 11. Deutlich ist die Stimulierung des SCC und des Na-Nettofluxes bei basischerem pH und die unmittelbare Umpolung der Cornea auf pH-Wechsel zu sehen. Berechnet man aus den Halbstundenmitteln von PD und SCC den elektrischen Widerstand der Cornea für die Perioden gleichen pH-Wertes, so erhält man $R = 1,2 \text{ k}\Omega/\text{cm}^2$ bei pH 7,6 und einen ungefähr halb so großen $R = 0,53 \text{ k}\Omega/\text{cm}^2$ für pH 8,6 (Tab. 1).

Für die Entwicklung der Na-Fluxe und den Gesamtwiderstand der Cornea waren neben dem absoluten pH-Wert auch die Reihenfolge des pH-Wechsels von Bedeutung. In der ersten Versuchsreihe kam es bei gleichbleibendem unidirektionalem Influx bei pH 8,6 zu einer signifikanten Steigerung des unidirektionalen Outflux und damit zu einem hochsignifikanten Na-Nettotransport zur Epithelseite (Abb. 4-6). Der Gesamtwiderstand R nahm von $2,57 \text{ k}\Omega/\text{cm}^2$ bei pH 7,6 auf $0,48 \text{ k}\Omega/\text{cm}^2$ bei pH 8,6 ab. Anders in der zweiten Versuchsserie, wo anfangs eine Steigerung vom unidirektionalen Influx bei kontinuierlicher Verminderung des unidirektionalen Outflux zu verzeichnen war (Abb. 8), bei insgesamt geringem Überwiegen des Outflux. Bei pH 7,6 kam es zwar zu einer signifikanten Abnahme des unidirektionalen Outflux, aber zu keiner signifikanten Änderung des Na-Nettoflux (Abb. 3) wie nach den Ergebnissen der ersten Versuchsreihe zu erwarten gewesen wäre. Wie aus Abb. 7 ersichtlich, veränderte sich der Widerstand R bei pH-Wechsel nicht.

Mittelt man aus beiden Versuchsserien PD-, SCC- und Nettofluxwerte der Halbstundenperioden bei pH 7,6 und pH 8,6, so ergibt sich ein augenfälliger Zusammenhang zwischen den drei Parametern, und der Schluß liegt nahe, daß der Na-Transport an der Umpolung des Potentials bei pH-Wechsel beteiligt ist (Abb. 11).

In Abb. 12 ist der Zusammenhang von pH und Na-Transport dargestellt: der unidirektionale Influx wurde bei pH-Wechsel nicht beeinflusst, während beim unidirektionalen Outflux eine Steigerung von 100 % beim Umschalten von pH 7,6 auf pH 8,6 auftritt, nämlich von $1,1 \mu\text{Äq/cm}^2 \cdot \text{h}$ auf $2,3 \mu\text{Äq/cm}^2 \cdot \text{h}$. ($p < 0,001$). Dadurch stieg der Nettoflux von Na von der Endothel- zur Epithelseite von $0,1 \mu\text{Äq/cm}^2 \cdot \text{h}$ bei pH 7,6 um das 10-fache auf $1 \mu\text{Äq/cm}^2 \cdot \text{h}$ bei pH 8,6.

Mittelt man entsprechend die SCC-Werte und vergleicht sie über Gleichung (3) (siehe 2.5.3) mit den Na-Nettofluxen, so erhält man eine Aussage darüber, wie weit der SCC durch den Na-Transport zu erklären ist. Tabelle 1 gibt den SCC, den Na-Nettoflux, das Verhältnis dieser beiden Parameter, ihren Korrelationskoeffizienten r sowie den aus PD und SCC errechneten Widerstand R an.

Tabelle 1

	SCC ($\mu\text{Äq/cm}^2 \cdot \text{h}$)	Na-Flux ($\mu\text{Äq/cm}^2 \cdot \text{h}$)	SCC/Na-Flux	Korrel. (r)	R ($k\Omega \cdot \text{cm}^2$)
pH 7,6	$2,2 \cdot 10^{-2}$	$10 \cdot 10^{-2}$	1 : 4	0,5	1,2
pH 8,6	$6,5 \cdot 10^{-2}$	$104 \cdot 10^{-2}$	1 : 16	0,35	0,5

Für pH 7,6 lag der SCC im Mittel bei $0,64 \pm 0,16 \mu\text{A/cm}^2$, für pH 8,6 bei $1,73 \pm 0,3 \mu\text{A/cm}^2$. Nach Gleichung (3) sind $0,64 \mu\text{A/cm}^2 \hat{=} 2,24 \cdot 10^{-2} \mu\text{Äq/cm}^2 \cdot \text{h}$. Der mit radioaktiv markierten Isotopen bestimmte Na-Nettotransport von $0,1 \mu\text{Äq/cm}^2 \cdot \text{h}$ ist also 4-5 mal größer als der aus dem SCC berechnete Nettoladungstransport.

Bei pH 8,6 übertrifft der aus dem SCC berechnete Transport von $6,45 \cdot 10^{-2} \mu\text{Äq/cm}^2 \cdot \text{h}$ den Na-Isotopenflux von $1,04 \mu\text{Äq/cm}^2 \cdot \text{h}$ sogar um das 16fache.

Somit muß ein Transport zusätzlicher Ionen an der menschlichen Cornea diskutiert werden, und zwar ein Anionentransport in Richtung des Na-Transportes oder ein Kationentransport in entgegengesetzter Richtung.

Bisherige Untersuchungen ähnlicher Art wurden überwiegend an der Rinder-, Frosch- und Kaninchen Cornea unternommen. Potts und Modrell (28, 31) erhielten an der Rinder Cornea bei pH 7,6 und einer Temperatur von 27°C eine PD zwischen 0,6 und 2,2 mV, Epithel negativ gegen Endothel, und einen SCC von max. $10\text{ }\mu\text{A}/\text{cm}^2$. Durch Veränderung des pH im Bereich 6,0 bis 8,0 wurde kein Effekt auf PD und SCC erzielt. Ein Na-Transport wurde in Experimenten, in denen Na gegen K ausgetauscht wurde, nachgewiesen.

Candia, Klyce und Zadunaisky (6, 7, 24, 35, 36) fanden an der Frosch Cornea eine PD von 10-60 mV, Epithel negativ gegen Endothel, und einen SCC zwischen 6 und $40\text{ }\mu\text{A}/\text{cm}^2$. Ein Auswärtstransport von Cl, der mit dem SCC übereinstimmte, wurde nachgewiesen; ein Netto-Na-Flux ließ sich nicht demonstrieren. Zadunaisky (36) fand einen pH-Effekt, ähnlich dem von uns für die menschliche Cornea nachgewiesenen, nämlich PD-Abfall beim Wechsel von pH 8,0 auf pH 7,6, jedoch fand keine Umpolung statt. Candia (7) wies die Wirkung eines pH-Wechsels von pH 8,6 auf pH 7,6 auf den Cl-Transport nach, und zwar waren der Nettoauswärtstransport und der SCC bei pH 7,6 signifikant und reversibel herabgesetzt, der elektrische Widerstand erhöht.

Mehrere Autoren (1, 11, 16, 19, 24, 35) fanden an der Kaninchen Cornea eine PD von 6-40 mV, Epithel negativ gegen Endothel, und einen SCC um $10\text{ }\mu\text{A}/\text{cm}^2$. Donn et al (11, 12) wiesen als erste den aktiven Na-Nettotransport auf die Endothelseite der Cornea nach, der mit dem SCC übereinstimmte, und in der Größenordnung dem Na-Transport an der menschlichen Cornea vergleichbar ist. Green (19)

beschrieb später einen zusätzlichen passiven Cl-Flux.

An der Cornea des Rhesusaffen haben Fischer et al. (16) bei pH 7,6 und pH 8,6 PD- und SCC-Werte gemessen, die am besten mit den von uns an der menschlichen Cornea erhaltenen übereinstimmen: bei pH 7,6 eine PD von -2 bis -4 mV, einen SCC von $2-3 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ und bei pH 8,6 eine PD zwischen 1 und 2 mV bei einem SCC von $1-3 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, jeweils Epithel gegen Endothel gemessen.

An der menschlichen Cornea sind zum Teil widersprüchliche Ergebnisse publiziert worden. So konnte Ehlers 1969 (14) bei intrazellulärer Ableitungstechnik im Corneae epithel keine signifikante PD nachweisen, während Lichey et al. (25) unter Versuchsbedingungen, die unseren entsprachen, eine PD von max. 45 mV fand, was auf eine erhebliche Transportkapazität hinweist. Fischer et al. (16) berichten von PD- und SCC-Werten und deren pH-Abhängigkeit, die denen in der vorliegenden Arbeit entsprechen.

Übereinstimmend fanden also alle Autoren an der Cornea von Rind, Frosch und Kaninchen eine PD zwischen 2 und 60 mV, wobei die Epithelseite stets negativ gegen die Endothelseite geladen war. Zadunaisky (36) und Candia (7) wiesen an der Froschcornea einen pH-Effekt nach, der unserem Befund in der Tendenz entsprach, d. h. Stimulierung des Ionenfluxes (beim Frosch Cl) und des SCC und Vergrößerung des negativen Potentials auf der Epithelseite bei pH 8,0 - 8,6 gegenüber dem saureren pH 7,2 - 7,6. Eine Umpolung der Cornea im Bereich pH 7,6 - 8,6 wiesen bisher nur Fischer et al. (16) in den Arbeiten an der Cornea des Menschen und des Rhesusaffen nach.

Offensichtlich hängt nach unseren Ergebnissen die Umpolung der Cornea mit dem Na-Transport zusammen, ist aber nicht allein durch ihn zu erklären. Ein Na-Nettoflux war bei pH 7,6 nicht nachweisbar, bei pH 8,6 von der Endothel- zur Epithelseite gerichtet

und war ferner bei pH 7,6 signifikant geringer als bei pH 8,6 (Abb. 12). Diese Befunde stimmen insofern mit der gemessenen PD überein, als es tatsächlich bei basischerem pH zu einer Verstärkung des positiven Potentials auf der Epithelseite kommt. Sie können aber nicht die Entstehung des negativen Potentials bei pH 7,6 erklären. Die Diskrepanz des gemessenen SCC zum Na-Nettotransport (Tab. 1) weist auf einen weiteren Ionentransport hin. Da der Na-Transport den aus dem SCC berechneten tatsächlichen Nettotransport der Cornea um das 4-fache bei pH 7,6 und um das 16-fache bei pH 8,6 übersteigt, sind entweder ein Anionenauswärtstransport oder ein umgekehrter Kationentransport oder beide Transporte in verschiedener quantitativer Ausprägung anzunehmen. Fischer et al. (16) fanden unter gleichen Versuchsbedingungen an der gleichen Versuchsanordnung einen ebenfalls von der Endothel-zur Epithelseite gerichteten Cl-Transport an der menschlichen Cornea, und zwar $0,14 \mu\text{Äq}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$ bei pH 7,6 und $0,2 \mu\text{Äq}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$ bei pH 8,6. Dieser vom pH-Wechsel nicht signifikant zu beeinflussende Cl-Transport vermag die große Diskrepanz zwischen SCC und Na-Transport nicht zu klären.

Möglich wäre ein Ca-Transport, wie er von Ezuka et al. (15) für die Kaninchencornea nachgewiesen wurde. So ist z. B. beim Menschen das Krankheitsbild der "gürtel- oder bandförmigen Hornhautdegeneration" bekannt, das u. a. bei Hypercalzaemie, Hyperparathyreoidismus und Vit. -D-Intoxikationen auftritt, (2, 3).

Wahrscheinlicher jedoch ist wegen der pH-Abhängigkeit ein Transportsystem aus H^+ und HCO_3^- . Es sind Beispiele eines solchen $\text{H}^+ \text{HCO}_3^-$ -Transportes mit und ohne Koppelung an andere Transportsysteme von anderen Epithelien bekannt. Chien und Stevens (9) fanden am Pansenepithel einen mit dem Na- und Cl-Transport gekoppelten HCO_3^- -Transport. Die Na-Transportraten waren dort 3 mal größer als der SCC. Erst nach Austausch von Cl^- und HCO_3^- gegen SO_4^{2-} und Trispuffer konnte Übereinstimmung von SCC und Na-Transport erzielt werden.

Ludens und Fanestil (27) fanden am Epithel der Krötenblase einen Na-Transport, der nicht mit dem SCC übereinstimmte. Außerdem wurden saure Valenzen in den Urin ausgeschieden. Dieser Ansäuerungsprozeß war unabhängig vom Na-Transport und nicht durch Strophantin hemmbar, aber abhängig von $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ und durch Acetazolamid beeinflussbar. Bei der Hemmung des Na-Transportes wurde eine Umpolung beschrieben, die nicht eintrat, wenn ein anderes Puffersystem benutzt wurde als Bicarbonat. Ähnliche Verhältnisse, wobei der Bicarbonat und H^+ -Transport wie oben an anderen Membranen beschrieben, unabhängig oder abhängig von den weiteren Transportsystemen ablaufen könnte, wären auch an der menschlichen Cornea denkbar.

Es könnte ein pH-Effekt entweder durch Beeinflussung eines Enzymsystems eintreten oder durch Veränderung der Valenzen in den Proteinketten des Stromas. So wäre es vorstellbar, daß bei pH 7,6 vermehrt NH_3^+ - und COOH -Gruppen im Stroma vorhanden wären, die ein Eindringen von Kationen erschweren könnten. Tatsächlich ist auch bei saurerem pH der Na-Transport auf die Epithelseite geringer als bei basischerem pH. Falls HCO_3^- dem Na^+ folgen würde, um Elektroneutralität zu gewährleisten, wäre der Bicarbonatflux gleichzeitig vermindert. Bei pH 8,6 lägen vermehrt NH_2 - und COO^- -Gruppen vor, die den Na-Ionen den Eintritt ins Stroma erleichtern würden, und ebenfalls damit den Bicarbonatflux auf die Epithelseite der Cornea erhöhten. Dieser dem Na-Flux folgende HCO_3^- -Strom würde die Ionentransportrate mehr dem gemessenen SCC angleichen. Die von pH 7,6 nach pH 8,6 hin größer werdende Diskrepanz zwischen Na-Flux und SCC spräche einmal dafür, daß die Permeabilität der Cornea für Bicarbonat begrenzt ist, zweitens für ein zusätzliches pH-induzierbares Transportsystem. Für ein Enzymsystem ist die pH-Abhängigkeit evident, Candia und Askew (8) erreichten z. B. eine Induzierung des Na-Transportes an der Froschcornea durch die Erniedrigung des pH mit 5% CO_2 .

Das oben postulierte Modell mit kombiniertem Transport von Na und Bicarbonat und seine Beeinflussung durch den pH hat nur dann einen physiologisch sinnvollen Effekt, wenn "Na- bzw. Bicarbonat-pumpe" im Corneaepithel lokalisiert sind und durch den Salztransport das Stroma entwässert wird. Ergebnisse von Lichey et al. (25), die bei intrazellulären Messungen am menschlichen Corneaepithel eine PD von max. 45 mV fanden, weisen auf eine hohe Transportaktivität hin. Insbesondere ist für die oben diskutierten Hypothesen eines NaCl und Bicarbonattransportsystems wichtig, daß die intrazelluläre PD durch Strophantin und Azetazolamid beeinflusbar war.

Ein weiterer Mechanismus zur Beeinflussung des Na-Transportes scheint in der Veränderung des Corneawiderstandes bei pH-Wechsel zu liegen. So errechneten wir aus den Mittelwerten von PD und SCC bei pH 7,6 einen Widerstand $R = 1,2 \text{ k}\Omega\text{cm}^2$ und bei pH 8,6 $R = 0,5 \text{ k}\Omega\text{cm}^2$. Allerdings zeigte sich dieser Unterschied nur in der ersten Versuchsreihe (3.2.1), bei der ein pH-Wechsel von anfänglich 7,6 auf 8,6 stattfand. In der zweiten Versuchsreihe änderte sich der Widerstand nicht und war bei pH 8,6 und pH 7,6 mit $0,8 \text{ k}\Omega\text{cm}^2$ identisch. Dieser Befund vermag vielleicht die Tatsache zu erklären, daß die Änderung des Na-Nettofluxes bei Wechsel von pH 7,6 auf pH 8,6 signifikant und wesentlich deutlicher war als beim Wechsel pH 8,6 nach pH 7,6. Nichtsdestoweniger waren die Veränderungen des Na-Outflux in beiden Versuchsreihen signifikant. Offensichtlich verändert der pH 8,6 einen Teil der Membranfunktion irreversibel, nämlich die Permeabilität für Na und vielleicht auch andere Ladungsträger, während die Transportraten der "Na-Pumpe" sich reversibel vom pH-Wert beeinflussen lassen.

Ob tatsächlich die H^+ -Ionenkonzentration in der Lösung oder auch der veränderte pCO_2 die Membranfunktion modifizierte, konnte in unseren Versuchen nicht unterschieden werden.

Es wird Aufgabe nachfolgender Untersuchungen sein, die aufgeworfenen Fragen durch Versuche zu klären, in denen eine pharmakologische Beeinflussung der fraglichen Transportsysteme erprobt werden könnte, oder in denen man durch Ersatz des $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ -Systems etwa durch Tris- bzw. andere Puffersysteme, weiteren Aufschluß über den tatsächlichen Mechanismus der pH-Wirkung erhalte.

5.0 Zusammenfassung

Es ist erstmalig gelungen den pH-Effekt auf PD, SCC und Na-Flux an der menschlichen Cornea in vitro zu messen.

Menschliche Cornea wurde 2 - 4 Stunden post mortem entnommen und in einer modifizierten Ussing-Zerahn-Kammer eingespannt. Die beiden Kammerhälften wurden sodann mit Ringer gefüllt, der teils mit Luft äquilibriert wurde, was einen pH von 8,6 in der Lösung herstellte, teils mit einem Gasgemisch aus 95 % Luft + 5 % CO_2 , was einen pH von 7,6 erbrachte.

Der pH-Wert wurde jeweils in der Versuchsmitte einmal gewechselt. Es liefen zwei Versuchsreihen mit verschiedener Reihenfolge des pH-Wechsels.

Die drei gemessenen Parameter verhielten sich wie folgt:

1. Bei pH 8,6 bestand ein von 0 signifikant verschiedener Na-Nettoauswärtstransport von $1,0 \pm 0,3 \mu\text{Äq}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$, der nicht mit dem SCC übereinstimmte.
2. Bei pH 7,6 waren unidirektionaler Influx und unidirektionaler Outflux einander angeglichen, so daß kein signifikanter Na-Netto-transport stattfand. Der Nettoflux stimmte ebenfalls nicht mit dem SCC überein.
3. Die Cornea war bei pH 7,6 negativ, bei pH 8,6 positiv geladen, jeweils Epithelseite gegen Endothelseite gemessen.
4. Bei pH-Wechsel kam es zum Umpolen der Cornea.

5. Die Reihenfolge des pH-Wechsels war für das Verhalten des elektrischen Gesamtwiderstandes der Cornea wichtig, bei Wechsel von pH 7,6 nach 8,6 sank R von $2,57 \text{ k}\Omega\text{cm}^2$ auf $0,48 \text{ k}\Omega\text{cm}^2$, während R bei umgekehrter pH-Folge mit $0,8 \text{ k}\Omega\text{cm}^2$ gleich blieb.

Der an der menschlichen Cornea gemessene SCC kann durch den gleichzeitig bestimmten Na-Transport nicht erklärt werden. Als weiterer Mechanismus wird ein pH-abhängiger H^+HCO_3^- -Transport angenommen.

6.0 Literaturverzeichnis

1. Akaike, N. and Hori, M.: Effect of anions and cations on membrane potential of rabbit corneal epithelium. Am. J. Physiol. 219: 1811-1818, 1970.
2. Axenfeld, Th. and H. Pau: Lehrbuch und Atlas der Augenheilkunde. Fischer Verlag, Stuttgart 1973.
3. Barber : Physiological Chemistry of the Eye. Arch. Ophthal. 87: 73-80, 1972.
4. Barraqueur, J. und J. Ruttlan: Die Chirurgie des vorderen Augenabschnittes. Bd. II, 1. Auflage 1971, Ferd. Enke Verl. (Stuttgart) (Kom.), Abschnitt: Cornea.
5. Campbell, R. C.: Statistische Methoden für Biologen und Mediziner. Thieme Verlag, Stuttgart 1971.
6. Candia, O. A.: Ouabain and sodium effects on chloride fluxes across the isolated bullfrog cornea. Am. J. Physiol. 223: 1053-1057, 1972.
7. Candia, O. A.: Effect of pH on chloride transport across the isolated bullfrog cornea. Exp. Eye Res. 15: 375-382, 1973.
8. Candia, O. A., W. A. Askew: Active sodium transport in the isolated bullfrog cornea. Biochem. Biophys. Acta 163: 262-265, 1968.
9. Chien, W. and C. E. Stevens: Coupled active transport of Na and Cl across forestomach epithelium. Am. J. Physiol. 223: 997-1003, 1972.
10. Dobson, J. G., G. W. K idder III: Edge damage effect in in vitro frog skin preparations. Am. J. Physiol. 214, 719-724, 1968.

11. Donn, A., D.M.Maurice, N.L.Mills: Studies on the living cornea in vitro. I. Method and physiological measurements. A.M.A. Arch. Ophthalmol. 62: 741-747, 1959.
12. Donn, A., D.M.Maurice, N.L.Mills: Studies on the living cornea in vitro. II. The active transport of sodium across the epithelium. A.M.A. Arch.Ophthalmol. 62: 748-757, 1959.
13. Edmonds, C.J.: Interpretation of electrical potential differences. Proc.Royal Soc.Med., 64: 1023-1025, 1971.
14. Ehlers, N.: Intracellular potentials of the corneal epithelium. Acta physiol.scand. 73: 471-477, 1970.
15. Ezuka, K., Y.Kikkawa, K.Kurosawa, N.Okada: Active Transport of Ca ions across the rabbit cornea. Jap.J.Physiol. 10: 204-210, 1960.
16. Fischer, F., Voigt, G., Liegl, O., Wiederholt, M.: Potential difference and short circuit current in the isolated human cornea. Pflügers Arch. 332 R 91, 1972.
17. Fischer, F., Schmitz, L., Hoff, W., Liegl, O., Wiederholt, M.: Influence of pH on potential difference, short circuit current and isotopic flux of sodium and chloride in the isolated human cornea. Pflügers Arch. 339 R 35, 1973.
18. Fuchs, G.: Mathematik für Mediziner und Biologen, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 1969.
19. Green, K.: Ion transport in isolated cornea of the rabbit. Am.J.Physiol. 209: 1311-1316, 1965.
20. Hutchinson, J.H., G.A.Porter: The role of bacterial contamination in isolated toad urinary bladder: Effect of antibiotics on aldosterone-stimulated active sodium transport and RNA specific activity. Res.Comm.Chem. Pathol Pharmac., 3: 1972.

21. Kadlec, O., R. Čapek, R.: Staphylococcal alpha-toxin (ST) effect on Ionic transport and permeability of isolated frog skin. Abstracts of the fourth International Congress on Pharmacology, Basel, Switzerland, pp. 323-324.
22. Katz, B.: Nerv, Muskel und Synapse. Einführung in die Elektrophysiologie Kapitel 4: Das Membrankonzept, Thieme Verlag, Stuttgart, 1971.
23. Kirsten, E., R. Kirsten: Increased activity of enzymes of the tricarboxylic acid cycle in response to aldosterone in the toad bladder. *Pflügers Arch.* 300: 213-225, 1968.
24. Klyce, S.D.: Electrical profiles in the corneal epithelium. *J. Physiol.* 226: 407-429, 1972.
25. Lichey, H. J., Fischer, F., Wiederholt, M.: Intracellular potentials in the isolated human cornea. *Pflügers Arch.* 346: 351-360, 1974.
26. Lindemann, B.: Resting potential of isolated beef cornea. *Exptl. Eye Res.* 7: 62-69, 1968.
27. Ludens, J. H., D. D. Fanestil: Acidification of urine by the isolated urinary bladder of the toad. *Am. J. Physiol.* 223: 1338-1344, 1972.
28. Modrell, R. W., A. M. Potts: The influence of medium composition, pH and temperature on the transcorneal potential. *Am. J. Ophthalmol.* 48. 834-842, 1959.
29. Monnier, M.: Physiologie und Pathophysiologie des vorderen Augenabschnittes. Bd. II Hippokrates Verlag, Stuttgart, 1963.
30. Oberhausen, E., H. Muth: Double Tracer Techniques, in: Laboratory Techniques in Membrane Biophysics, ed. by H. Passon and R. Stämpfli, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New-York, 1969.

31. Potts, A. M., R. W. Modrell: The transcorneal potential. *Am. J. Ophthalm.* 44: 284-290, 1957.
32. Schwartz, T. L.: Direct effects on the membrane potential due to "pumps" that transfer no net charge. *Biophysical Journal* 11: 944-960, 1971.
33. Ussing, H., K. Zerahn: Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta phys. scandinav.* 23: 110-127, 1951.
34. Walser, M.: Role of edge damage in the sodium permeability of toad bladder and a means of avoiding it. *Am. J. Physiol.* 219: 252-255, 1970.
35. Zadunaisky, J. A.: Electrophysiology and transparency of the cornea. In: *Electrophysiology of Epithelial Cells*, ed. by G. Giebisch, Schattauer Verlag, Stuttgart-New York, 1971.
36. Zadunaisky, J. A.: Active transport of chloride in frog cornea. *Am. J. Physiol.* 211: 506-513, 1966.

Herrn Prof. Dr. M. Wiederholt danke ich für die Überlassung des Themas, die immer freundliche Anleitung und die entspannte Atmosphäre in seiner Abteilung.

Herrn Dipl.-Ing. Dr. F. Fischer danke ich für die Hilfe bei den experimentellen Arbeiten.

Der medizinisch-technischen Assistentin, Frau Astrid Lübbemeier, danke ich für die Beratung in labortechnischen Fragen.

Herrn Priv. Doz. Dr. H. Ebel danke ich für die unermüdlichen Ermahnungen beim Umgang mit radioaktivem Material.

Lebenslauf

Als Sohn des Kaufmannes Günther Schmitz und seiner Ehefrau Hildegard, geb. Palmen, wurde ich am 19. September 1947 in Mönchengladbach geboren.

Von 1954 bis 1967 besuchte ich zunächst die Grundschule und danach das neusprachliche Gymnasium in Rheydt-Odenkirchen. Nach dem Abitur leistete ich einen einjährigen Grundwehrdienst. 1968 begann ich das Medizinstudium an der FU Berlin. 1969 bestand ich das Vorphysikum, 1971 die ärztliche Vorprüfung und 1975 die ärztliche Prüfung. Während des klinischen Studiums arbeitete ich bei Herrn Prof. Dr. M. Wiederholt an meiner Dissertation. Seit Oktober 1975 bin ich als Medizinalassistent tätig.

